



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 695 31 538 T2 2004.06.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 746 608 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 695 31 538.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/DK95/00076

(96) Europäisches Aktenzeichen: 95 909 664.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 95/022606

(86) PCT-Anmeldetag: 21.02.1995

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 24.08.1995

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 11.12.1996

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 20.08.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.06.2004

(51) Int Cl.: C12N 11/14

C12N 9/20

(30) Unionspriorität:

20794 21.02.1994 DK

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(72) Erfinder:

PEDERSEN, Sven, DK-2880 Bagsvaerd, DK;
LARSEN, Anne Morkeberg, DK-2880 Bagsvaerd, DK;
AASMÜL, Per, DK-2880 Bagsvaerd, DK

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER IMMOBILISIERTEN ENZYMPRÄPARATION UND IHRE
VERWENDUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingereicht, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

[0001] Die Erfindung umfasst ein Verfahren zur Herstellung einer immobilisierten Enzympräparation, welche ein Enzym umfasst, welches für eine organische Synthese in einem hauptsächlich organischen Medium ohne freies Wasser anwendbar ist, und eine Verwendung der immobilisierten Enzympräparation. Das geläufigste Enzym, welches für eine organische Synthese in einem hauptsächlich organischen Medium, frei von freiem Wasser, anwendbar ist, ist eine Lipase. Beispiele für andere Enzyme dieser Art sind Proteasen, Amidasen, Esterasen, Oxidoreduktasen und Nitrilasen. In dem Folgenden wird die Erfindung gewöhnlicherweise mit Verweis auf eine Lipase als das vorherrschende Beispiel für ein Enzym, welches für eine organische Synthese in einem hauptsächlich organischen Medium, frei von freiem Wasser anwendbar ist, beschrieben. Der Begriff "organische Synthese" soll als allgemein akzeptiert in der organischen Chemie verstanden werden. Daher sind typische Beispiele für organische Synthesen, die in den Schutzbereich der Erfindung eingeschlossen sind, die folgenden: Umesterungen, Transesterungen, Interesterungen, Acylierungen, Epoxidierungen, Aminolysen, Ammoniolyse, Oxidationen und Reduktionen. Der Begriff "hauptsächlich organisches Medium, frei von freiem Wasser" soll als ein Ein-Phase-Medium verstanden werden, dessen organischer Teil mindestens 50% w/w beträgt.

[0002] Immobilisierte Lipasepräparationen werden als Katalysatoren für eine Interesterung und andere Fett-bezogene Prozesse, z. B. Kakaobutterersatzherstellung, verwendet. In dem Fall einer Batch-Reaktion muss der Katalysator von der Reaktionsmischung für eine Wiederverwendung separiert werden, wenn die Reaktion beendet ist. Daher ist eine gute Filtrationsfähigkeit des Katalysators für eine befriedigende Leistung erforderlich.

[0003] WO 90/05778 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung einer immobilisierten Lipasepräparation, welche zum Beispiel für Margarineherstellung verwendbar ist. Diese Präparation umfasst einen makroporigen Silicaträger.

[0004] EP 140 542 beschreibt eine immobilisierte Lipasepräparation für eine Interesterung von Fetten. Diese Präparation umfasst einen Anionenaustauschharzträger. Beide diese immobilisierten Lipasepräparationen des Standes der Technik leiden unter dem Nachteil, dass sie sehr teuer sind. Besonders in Bezug auf die Herstellung von Margarine, welche in Millionen von Tonnen pro Jahr auf einer globalen Grundlage hergestellt wird, ist es wichtig, die Herstellungskosten zu minimieren.

[0005] Daher ist der Zweck der Erfindung die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung einer günstigen immobilisierten Enzympräparation, welche technische Eigenschaften aufweisen sollte, die gleich oder weitestgehend gleich zu den immobilisierten Enzympräparationen des Standes der Technik sind, besonders im Hinblick auf die Filtrierbarkeit nach einer beendeten chargenweisen Margarineherstellung und im Hinblick auf einen geringen Druckabfall in den Säulen für eine kontinuierliche Leistung, in dem Fall, dass das Enzym eine Lipase ist, und eine Verwendung solcher immobilisierten Enzympräparationen.

[0006] Das Verfahren gemäß der Erfindung zur Herstellung einer immobilisierten Enzympräparation, welche ein Enzym umfasst, das für eine organische Synthese in einem hauptsächlich organischen Medium, frei von freiem Wasser, anwendbar ist, ist durch die Tatsache gekennzeichnet, dass eine Lipidenzymzusammensetzung und ein teilchenförmiger („particulate“) Silicaträger mit einer Partikelgröße unterhalb von etwa 100 µm als Materialien verwendet werden, um in einen Granulator oder einen Extruder eingeführt zu werden, wonach eine Granulation oder eine Extrusion durchgeführt wird. Die Lipidenzymzusammensetzung kann nicht-wässrig, zum Beispiel auf Alkoholbasis, oder wässrig sein. Der teilchenförmige Silicaträger kann eine breite Partikelgrößenverteilung aufweisen, zum Beispiel zwischen etwa 5 µm und 100 µm. In dieser Beschreibung soll mit Beanspruchungen von "Silica" entweder Silica oder ein Silicat, zum Beispiel Magnesiumsilicat, verstanden werden. Es soll verstanden werden, dass die Erfindung sowohl die Situation, in der eine teilchenförmige immobilisierte Lipasezusammensetzung mit einer Partikelgrößenverteilung, welche ähnlich zu der Partikelgrößenverteilung des teilchenförmigen Silicaträgers zuerst hergestellt wird, wonach die Granulation oder Extrusion durchgeführt wird (siehe Beispiele 6 und 7) als auch die Situation, in der die Herstellung in lediglich einem Schritt durchgeführt wird (siehe Beispiele 1 bis 5) umfasst. Ebenfalls soll verstanden werden, dass das Enzym als ein Binder während der Granulation oder Extrusion wirken kann und/oder, dass ein spezifisches Bindemittel hinzugefügt werden kann, zum Beispiel Gelatine oder Polyvinylpyrrolidon. Während des Verfahrens gemäß der Erfindung wird vorzugsweise eine Versprühung durchzuführen sein, gewöhnlicherweise eine Versprühung der flüssigen Enzymzusammensetzung und/oder eine Versprühung des Bindemittels in flüssiger Form. Ebenfalls soll verstanden werden, dass der in dem Verfahren gemäß der Erfindung verwendete Apparat von keiner speziellen Wichtigkeit für die Erfindung ist, insofern als ein beliebiger Granulator, zum Beispiel ein Flussbettspraygranulator oder ein beliebiger Extruder verwendet werden kann.

[0007] Eine pulverisierte immobilisierte Lipasepräparation auf Silicabasis wird zum Beispiel in WO 88/02775, Seite 11, Zeilen 21-24 beschrieben. Diese immobilisierte Lipasepräparation ist sowohl für chargenweise als auch kontinuierliche Fett-bezogene Prozesse vollständig ungeeignet, aufgrund einer geringen Filtrierbarkeit nach einem Batch-Prozesses und der Erzeugung eines hohen Druckverlustes während eines kontinuierlichen

BEST AVAILABLE COPY

Säulenprozesses.

[0008] Immobilisierte Lipasepräparationen werden in EP 579928 und in Appl. Microbiol. Biotechnol. (1988) 28: 527-530 beschrieben, jedoch umfasst keine dieser Lipasepräparationen des Standes der Technik einen Silicaträger.

[0009] In Chem. Abstract Bd. 118 (1993): 55095v wird eine immobilisierte Lipasepräparation auf einem Silicaträger beschrieben. Jedoch wird das Verfahren gemäß der Erfindung, welches eine Partikelgröße des Trägers und eine Granulation oder eine Extrusion umfasst, nicht beschrieben.

[0010] Überraschenderweise ist gefunden worden, dass die immobilisierte Enzympräparation, welche in Übereinstimmung mit dem Verfahren gemäß der Erfindung zubereitet wird, an erster Stelle erheblich günstiger ist als die vergleichbaren Enzymzusammensetzungen des Standes der Technik, und an zweiter Stelle, dass sie technische Eigenschaften aufweist, welche gleich oder weitestgehend gleich zu den immobilisierten Enzympräparationen des Standes der Technik sind, zum Beispiel im Hinblick auf die Filtrierbarkeit nach einem charge- weisen Fett-bezogenen Prozess und der Erzeugung eines geringen Druckverlustes während eines kontinuierlichen Fett-bezogenen Prozesses, wenn das Enzym eine Lipase ist.

[0011] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung ist durch die Tatsache gekennzeichnet, dass das Enzym eine Lipase ist.

[0012] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung ist durch die Tatsache gekennzeichnet, dass die Lipase in der flüssigen Lipasezusammensetzung eine thermostabile Lipase ist.

[0013] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung ist durch die Tatsache gekennzeichnet, dass die Lipase in der flüssigen Lipasezusammensetzung durch die Kultivierung eines Mikroorganismus hergestellt wird, welcher ein Gen enthält, welches für eine Lipase kodiert und eine Lipase exprimiert, welche von einem Stamm von *Humicola* Arten, *Candida antarctica* oder *Rhizomucor miehei* abgeleitet ist.

[0014] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung ist durch die Tatsache gekennzeichnet, dass die Proportion zwischen der Menge der flüssigen Lipasezusammensetzung und dem Gewicht des teilchenförmigen Silicaträgers mindestens 100.000 LU/g des Trägers (Trockengewicht) beträgt. LU ist die Lipaseaktivitätseinheit, definiert in Ausführungsform 95 1/2-GB, welche auf Anfrage von Novo Nordisk AIS erhalten werden kann. Der LU-Test verwendet Tributyn als ein Substrat zur Bestimmung der Lipaseaktivität.

[0015] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung wird durch die Tatsache gekennzeichnet, dass das Silica eine Reinheit von mindestens 50%, bevorzugt mindestens 75% besitzt.

[0016] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung wird durch die Tatsache gekennzeichnet, dass ein Granulator verwendet wird, bevorzugt ein Hochgeschwindigkeitsmixer oder ein Mixergranulator.

[0017] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung ist durch die Tatsache gekennzeichnet, dass eine flüssige Zusammensetzung eines Binders, bevorzugt Gelatine oder Polyvinylpyrrolidon, durch eine Versprühung in den Granulator oder Extruder während der Granulation oder Extrusion eingeführt wird.

[0018] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung ist durch die Tatsache gekennzeichnet, dass die Granulation oder Extrusion für die Herstellung der immobilisierten Lipasepräparation mit einer Partikelgrößenverteilung, welche einer Menge von mindestens 90% zwischen 50 µm und 2.000 µm entspricht, durchgeführt wird.

[0019] Die Verwendung der immobilisierten Enzympräparation, welche mittels des Verfahrens gemäß der Erfindung zubereitet wird, ist für den Prozess, welcher durch das Enzym katalysiert wird.

[0020] Die Verwendung der immobilisierten Enzympräparation, welche mittels des Verfahrens gemäß der Erfindung zubereitet wird, ist für Fett-bezogene Prozesse. Es soll verstanden werden, dass solche Fett-bezogenen Prozesse charge-weise oder kontinuierlich verarbeitet werden können. Wenn sie charge-weise verarbeitet werden, ist gefunden worden, dass die immobilisierte Lipasepräparation, welche mittels des Verfahrens gemäß der Erfindung hergestellt wird, eine befriedigende Filterbarkeit aufweist, wenn der enzymatische Prozess zum Ende gekommen ist, und, wenn er kontinuierlich verrichtet wird ist gefunden worden, dass die immobilisierte Lipasepräparation, welche mittels des Verfahrens gemäß der Erfindung hergestellt wird, eine gute physikalische Stärke aufweist, welches in einer befriedigenden Leistung der Säule resultiert.

[0021] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung ist für eine Interesterung von Fetten und ist durch die Tatsache gekennzeichnet, dass flüssige Fette oder Fettmischungen, einschließlich freien Fettsäuren oder Fettsäureestern, mit der immobilisierten Lipasepräparation in Kontakt gebracht werden.

[0022] Eine bevorzugte Ausführungsform der Verwendung gemäß der Erfindung ist eine Synthese von Glyceriden oder anderen Fettsäureestern und ist durch die Tatsache gekennzeichnet, dass eine Mischung aus Glycerol oder substituierten Glycerolen oder anderen Alkoholtypen und freien Fettsäuren mit der immobilisierten Lipasepräparation in Kontakt gebracht wird.

[0023] Eine bevorzugte Ausführungsform der Verwendung gemäß der Erfindung ist eine Synthese von Gly-

BEST AVAILABLE COPY

colipiden. Die Synthese von Glycolipiden mit immobilisierten Lipasepräparationen im Allgemeinen beschreiben in Björkling, F. et al. (1989), J. Chem. Soc., Chem. Commun., S. 934–935.

[0024] Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele illustriert werden.

[0025] Alle Herstellungsbeispiele (1–8) illustrieren die chargenweise Ausführung des Verfahrens gemäß der

Erfindung. Für eine Produktion in industriellem Maßstab wird gewöhnlicherweise die kontinuierliche Ausführungsform bevorzugt werden. Beispiel 9 ist ein Verwendungsbeispiel.

[0026] Die Verwendung gemäß der Erfindung wird indirekt in den Beispielen 1–8 illustriert, in Erwägung der Tatsache, dass jede BAUN-Bestimmung die Verwendung (Interesterung) gemäß der Erfindung illustriert. Die Verwendung gemäß der Erfindung wird direkt in Beispiel 9 illustriert.

[0027] Fig. 1, welche sich direkt auf Beispiel 9 bezieht, zeigt die Konversion in Bezug zu einer Estersynthese, welche als eine kontinuierliche Säulenbedienung, abhängig von der Zeit, durchgeführt wird.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

[0028] 65 g eines Pulvers aus synthetischem Magnesiumsilicat, Celkate T-21 (Manville) wurde in einen Hochgeschwindigkeitsmixer mit einem Impeller eingeführt, welcher mit einer Geschwindigkeit von 900 rpm bedient werden kann. 75 g Humicola lanuginosa Lipaseflüssigkonzentrat (zubereitet gemäß des Dänischen Patents Nr. 157560 mit Humicola lanuginosa DSM 3819, Trockensubstanzgehalt 30%, mit Aktivität von 700.000 LU/ml) wurde kontinuierlich auf das Silicapulver über einen Zeitraum von ungefähr fünf Minuten mit laufendem Impeller versprüht. Das gebildete Granulat wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und durchgesiebt (300–700 µm). Der Feuchtigkeitsgehalt wurde auf 10% eingestellt und die Probe mit 2,6 BAUN/g analysiert. Der Lipaseaktivitätstest, ausgedrückt in BAUN (Batch Acidolysis Units Novo) misst die Anfangsrate des Einbaus von Dekansäure („decanoic acid“) in Hocholeatsonnenblumenöl („high oleate sunflower oil“) (10% Wasser, 70°C). Eine detaillierte Beschreibung des Verfahrens (MP 9410704) ist auf Anfrage von Novo Nordisk A/S erhältlich. Der Test wurde ohne magnetisches Rühren, jedoch in einem Schüttelwasserbad, durchgeführt.

BEISPIEL 2

[0029] 65 g Celkate T-21 wurde in einen Hochgeschwindigkeitsmixer, wie in Beispiel 1 angezeigt, eingeführt. 25 g Humicola lanuginosa Lipaseflüssigkonzentrat, wie in Beispiel 1 angezeigt, wurde kontinuierlich auf das Pulver bei laufendem Impeller versprüht. Hiernach wurden 50 g des Humicola lanuginosa Lipaseflüssigkonzentrats mit 3% (w/w) Kollidon K25 Polyvinylpyrrolidon (BASF) auf das Pulver versprüht. Das gebildete Granulat wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und durchgesiebt (300–700 µm). Der Feuchtigkeitsgehalt wurde auf 10% eingestellt und die Probe mit 0,5 BAUN/g analysiert.

BEISPIEL 3

[0030] 40 g eines Pulvers von kalzinerter diatomeenartiger Erde, Clarcel CBL 3 (Ceca S.A.) wurde in einen Hochgeschwindigkeitsmixer, wie in Beispiel 1 angezeigt, eingeführt. 11 g Humicola lanuginosa Lipaseflüssigkonzentrat, wie in Beispiel 1 angezeigt, wurde kontinuierlich auf das Pulver bei laufendem Impeller versprüht. Danach wurden 47 g der Humicola lanuginosa Lipase mit 3% (w/w) Kollidon K25 auf das Pulver bei laufendem Impeller versprüht. Das gebildete Granulat wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und durchgesiebt (300–700 µm). Der Feuchtigkeitsgehalt wurde auf 10% eingestellt und die Probe mit 2,4 BAUN/g analysiert.

BEISPIEL 4

[0031] 50 g Clarcel CBL 3 wurden in einen Hochgeschwindigkeitsmixer, wie in Beispiel 1 angezeigt, eingeführt. 72 g Humicola lanuginosa Lipaseflüssigkonzentrat, wie in Beispiel 1 angezeigt, mit 5% (w/w) Gelatine (ASF Gelatin, Sanofi Bio-Industries) wurde kontinuierlich auf das Pulverflüssigkonzentrat, wie in Beispiel 1 angezeigt, versprüht. Das gebildete Granulat wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und durchgesiebt (300–700 µm). Der Feuchtigkeitsgehalt wurde auf 10% eingestellt und die Probe mit 5,1 BAUN/g analysiert.

BEISPIEL 5

[0032] 30 g Clarcel CBL 3 und 20 g Talkpulver wurde in einen Hochgeschwindigkeitsmixer, wie in Beispiel 1 angezeigt, eingeführt. 20 g Humicola lanuginosa Lipaseflüssigkonzentrat, wie in Beispiel 1 angezeigt, wur-

BEST AVAILABLE COPY

de kontinuierlich auf das Pulverflüssigkeitskonzentrat, wie in Beispiel 1 angezeigt, versprüht. Danach wurden 28 g des *Humicola lanuginosa* Lipaseflüssigkeitskonzentrat mit 2% (w/w) Methocel A-15 Methylcellulose (Dow) auf das Pulver bei laufendem Impeller versprüht. Das gebildete Granulat wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und durchgesiebt (300–700 µm). Der Feuchtigkeitsgehalt wurde auf 10% eingestellt und die Probe mit 7,7 BAUN/g analysiert.

BEISPIEL 6

[0033] 250 g Celkate T-21 wurde mit 3 Volumina 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,5, für 30 Minuten gewaschen, gefolgt von einer Vakuumfiltration. *Humicola lanuginosa* Lipasekonzentrat, wie in Beispiel 1 angezeigt, wurde in einer Menge, welche 500.000 LU/g des Celkate T-21 entspricht, zusammen mit 3 Volumina 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,5, hinzugefügt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Vakuumfiltration wurde die immobilisierte Lipase für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, der Feuchtigkeitsgehalt wurde auf 10% eingestellt und mit 14,3 BAUN/g analysiert. Das Filtrat enthielt 27565 kLU, entsprechend einer Adsorption von 78% (oder 390 kLU/g).

[0034] 65 g der so getrockneten immobilisierten Phase auf Celkate T-21-Pulver wurden in einen Hochgeschwindigkeitsmixer, wie in Beispiel 1 angezeigt, eingeführt. 55 g einer 5% (w/w) Gelatinelösung wurde auf das Pulver bei laufendem Impeller versprüht. Hiernach wurde 0,1 g Aerosil 200 Siliciumdioxid (Degussa) hinzugefügt. Das gebildete Granulat wurde bei Raumtemperatur getrocknet und durchgesiebt (300–700 µm). Der Feuchtigkeitsgehalt wurde auf 10% eingestellt und analysiert mit 5,9 BAUN/g.

BEISPIEL 7

[0035] 200 g Clarcel CBL 3 wurden mit 3 Volumina 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,5, für 30 Minuten gewaschen, gefolgt von einer Vakuumfiltration. *Humicola lanuginosa* Lipasekonzentrat, wie in Beispiel 1 angezeigt, wurde in einer Menge, welche 500.000 LU/g Clarcel CBL 3 entsprach, hinzugefügt zusammen mit 3 Volumina 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,5, für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Vakuumfiltration wurde die immobilisierte Lipase zweimal mit 2–3 Volumina 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,5, und zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die Filtrate enthielten 82761 kLU gesamt, entsprechend einer Adsorption von 17% (oder 86 kLU/g). Die immobilisierte Lipase wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und mit 13,4 BAUN/g analysiert.

[0036] 55 g der so gewaschenen immobilisierten Lipase auf Clarcel CBL 3-Pulver wurde in einen Hochgeschwindigkeitsmixer, wie in Beispiel 1 angezeigt, eingeführt. 61 g einer Lösung, welche 2% (w/w) Gelatine und 1% (w/w) Methocel A-15 Methylcellulose (Dow) enthielt, wurde kontinuierlich auf das Pulver bei laufendem Impeller versprüht. Danach wurde 0,1 g Aerosil 200 Siliciumdioxid (Degussa) hinzugefügt. Das gebildete Granulat wurde bei Raumtemperatur getrocknet und durchgesiebt (300–700 µm). Der Feuchtigkeitsgehalt wurde auf 10% eingestellt und mit 8,4 BAUN/g analysiert.

[0037] Ein anderer Teil, d. h. 59 g der so gewaschenen immobilisierten Lipase auf Clarcel CBL 3-Pulver wurde in einen Hochgeschwindigkeitsmixer, wie in Beispiel 1 angezeigt, eingeführt. 59 g einer 5% (w/w) Gelatinelösung wurde kontinuierlich auf das Pulver bei laufendem Impeller versprüht. Danach wurde 0,1 g Aerosil 200 Siliciumdioxid (Degussa) hinzugefügt. Das gebildete Granulat wurde bei Raumtemperatur getrocknet und durchgesiebt (300–700 µm). Der Feuchtigkeitsgehalt wurde auf 10% eingestellt und mit 10,1 BAUN/g analysiert.

BEISPIEL 8

[0038] Dies ist ein Herstellungsbeispiel, wie die Beispiele 1–7, jedoch mit einem anderen Lipase-herstellenden Mikroorganismus.

[0039] Präparation der Probe 1: 12,9 g *Candida antarctica* B Lipase gefergetrocknetes Pulver mit einer Aktivität von 250.000 LU/g und 1,4 g Kollidon K25 wurde in 51 ml deionisiertem Wasser aufgelöst. 50 g Celkate T-21 wurden in einen Hochgeschwindigkeitsmixer, wie in Beispiel 1 angezeigt, eingeführt und die oben angezeigte Lösung der *Candida antarctica* B Lipase wurde kontinuierlich auf das Pulver bei laufendem Impeller versprüht. Das gebildete Granulat wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und durchgesiebt (300–1000 µm).

[0040] Präparation der Probe 2: 12,9 g *Candida antarctica* B Lipase und 0,86 g Methocel A-15 wurden in 51 ml deionisiertem Wasser aufgelöst. 50 g Celkate T-21 wurde in einen Hochgeschwindigkeitsmixer eingeführt und die obige Lösung wurde kontinuierlich auf das Pulver bei laufendem Impeller versprüht. Das gebildete Granulat wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und durchgesiebt (300–1000 µm).

[0041] Präparation der Probe 3: 12,8 g *Candida antarctica* B Lipase und 0,81 g Kollidon K25 wurden in 48 ml deionisiertem Wasser aufgelöst. 50 g Celkate T-21 wurden in einen Hochgeschwindigkeitsmixer eingeführt und

BEST AVAILABLE COPY

DE 695 31 538 T2 2004.06.24

zung durch Versprühung in den Granulator oder Extruder während der Granulation oder Extrusion hinzugefügt wird.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

BEST AVAILABLE COPY

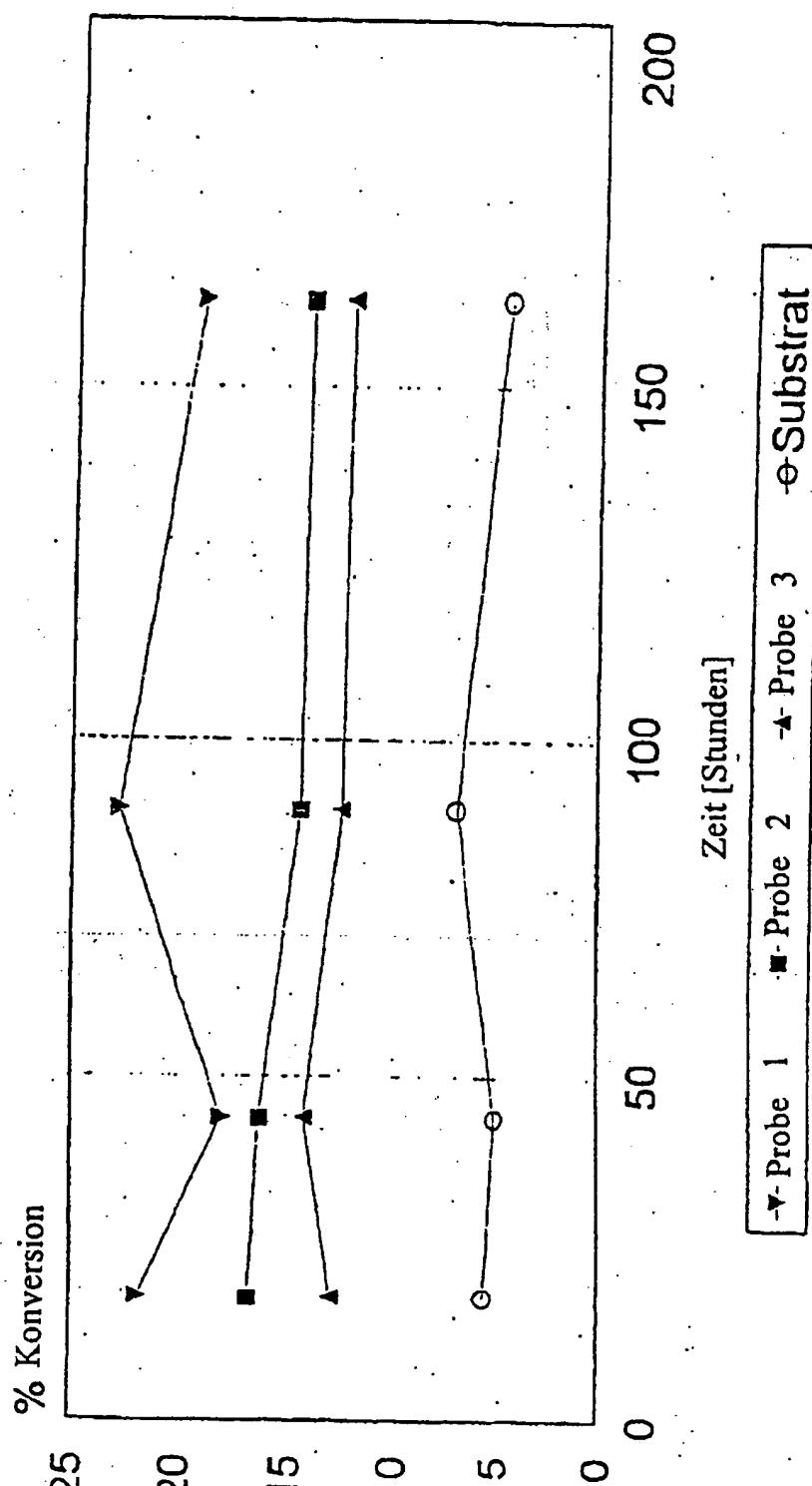


FIG. 1